粘虫过氧化氢酶基因的克隆与表达分析

李鸿波，戴长庚，张昌容，何永福*，胡　阳*

（贵州省农业科学院植物保护研究所，贵阳 550006）

摘要：【目的】过氧化氢酶(CAT)的主要功能是将过氧化氢分解成水和氧气，从而使生物免受氧化损伤的伤害。本研究旨在探索 CAT 在粘虫 *Mythimna separata* 抗氧化胁迫中的作用。【方法】采用 RT-PCR 和 RACE 技术克隆粘虫 CAT 基因的 cDNA 全长序列和基因组序列，利用生物信息学软件分析该基因及其编码蛋白质的序列特性；运用实时荧光定量 PCR(qPCR)技术分析该基因在不同发育阶段(卵、1 – 6 龄幼虫、蛹和成虫)、5 龄幼虫不同组织(头、表皮、前肠、中肠、后肠和马氏管)以及毒死蜱、高温和密度胁迫下幼虫中的表达谱。【结果】克隆得到的粘虫 CAT 基因命名为 *MsCAT*(GenBank 登录号：MF737386)，其全长 cDNA 长 1 846 bp，开放阅读框为 1 602 bp，编码 533 个氨基酸。序列分析发现 MsCAT 具有 CAT 家族典型的结构域，包括一个基部活化位点标签(^{88}FDRERIPERVVHAKGAGA^{105})，一个 NADPH 结合位点(^{216}VTHQVLYLFGD^{226})和一个亚铁血红蛋白结合位点(^{379}RLFSYSDTH^{386})。DNA 序列分析表明，在 *MsCAT* 编码区 99 bp 处插入了一个 612 bp 的内含子。系统发育分析显示，MsCAT 与夜蛾科(Noctuidae)昆虫的亲缘关系最近。*MsCAT* 在粘虫的各个发育阶段和 5 龄幼虫各组织中均表达，分别在 6 龄幼虫和幼虫中肠中的表达量最高。取食经 1 μg/mL 毒死蜱处理的玉米叶片 24 h 后，幼虫体内 *MsCAT* 表达量显著上调，但随浓度提高，表达量反而下降；在 33 ~ 37℃温度处理后，幼虫 *MsCAT* 的表达量显著高于对照(24℃)，而 39℃处理幼虫 *MsCAT* 的表达量下调；此外，随饲养密度的增加幼虫体内 *MsCAT* 的表达显著下调。【结论】本研究克隆得到的粘虫 CAT 基因的 cDNA 全长序列(*MsCAT*)是可靠的，并且 *MsCAT* 在粘虫发育及抗氧化胁迫中具有重要的作用。

关键词：粘虫；过氧化氢酶；基因克隆；表达谱；氧化胁迫；实时荧光定量 PCR

中图分类号：Q966　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2018)02-0178-10

Cloning and expression profiling of catalase gene in the oriental armyworm, *Mythimna separata* (Lepidoptera: Noctuidae)

LI Hong-Bo, DAI Chang-Geng, ZHANG Chang-Rong, HE Yong-Fu*, HU Yang* (Institute of Plant Protection, Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang 550006, China)

Abstract: 【Aim】Catalase (CAT) plays an important role in decomposing hydrogen peroxide into water and oxygen which makes an organism avoiding the damage of oxidative stress. This study aims to explore the roles of CAT in anti-oxidative stress in the oriental armyworm, *Mythimna separata*.【Methods】The complete cDNA and genomic sequence of *CAT* in *M. separata* were cloned by RT-PCR and RACE. Bioinformatics programs were used to analyze the sequence characteristics of the gene and encoded protein. The expression levels of *CAT* in *M. separata* in different developmental stages (egg, 1st – 6th

基金项目：公益性(农业)科研专项(201403031)；国家自然科学基金项目(31601633)；贵州省自然科学基金(黔科合 J 字[2014]2121)；贵州省农科院博士启动项目(201301)；黔农科院院专项(2014030)；科研机构服务企业行动计划(黔 2015-4012)

作者简介：李鸿波，男，1985 年 6 月生，贵州绥阳县人，博士，副研究员 研究方向为昆虫分子生态学与害虫综合治理，E-mail：gzlhb2017@126.com

* 通讯作者 Corresponding authors, E-mail: huyanggz@126.com; heyongfu08@163.com

收稿日期 Received: 2017-09-15；接受日期 Accepted: 2017-12-15

instar larva, pupa and adult), tissues of the 5th instar larva (head, cuticle, foregut, midgut, hindgut and Malpighian tubules), and larvae under chlorpyrifos exposure, high temperature stress and larval crowding conditions were detected by quantitative real-time PCR (qPCR). 【Results】The complete cDNA of *CAT* obtained from *M. separata* was named as *MsCAT* (GenBank accession no.: MF737386), which is 1 846 bp in length, with a 1 602 bp opening reading frame (ORF) encoding 533 amino acids. Sequence analysis indicated that MsCAT has three typical motifs of CAT family, including one proximal active site (^{88}FDRERIPERVVHAKGAGA^{105}), one NADPH binding site (^{216}VTHQVLYLFGD^{226}) and one proximal heme-ligand signature sequence (^{379}RLFSYSDTH^{386}). The DNA sequence of *MsCAT* contains a 612 bp intron that inserts into the location behind the 99th bp of the encoding region. Phylogenetic analysis indicated that CATs from Noctuidae moths could be assigned to one well-supported cluster. *MsCAT* was expressed in various developmental stages and tissues of the 5th instar larva of *M. separata*, and exhibited the highest expression level in the 6th instar larval stage and larval midgut, respectively. *MsCAT* was significantly up-regulated in larvae fed on corn leaves treated by low concentration (1 μg/mL) of chlorpyrifos for 24 h, but down-regulated in larvae fed on high concentrations of chlorpyrifos. The expression level of *MsCAT* was significantly up-regulated in larvae exposed to temperatures from 33 to 37℃, but declined in larvae exposed to 39℃ as compared with that of the control (24℃). The expression level of *MsCAT* in *M. separata* larvae was negatively related to their crowding degree. 【Conclusion】The obtained full-length cDNA of *MsCAT* encoding CAT in *M. separata* is reliable, and *MsCAT* may play an important role in development and oxidative stress tolerance of *M. separata*.

Key words: *Mythimna separata*; catalase; gene cloning; expression profiles; oxidative stress; quantitative real-time PCR

昆虫不具备后天免疫系统,因而必须依赖先天免疫系统来抵御各种环境胁迫因子带来的伤害(Iwanaga and Lee, 2005; Lemaitre and Hoffmann, 2007)。在环境胁迫条件下,生物体内会产生多种活性氧(ROS),主要包括超氧化物阴离子(O_2^-)、过氧化氢(H_2O_2)和氢氧根离子(·OH)(Imai and Nakagawa, 2003; Suzuki *et al*., 2012)。活性氧作用就是减少环境胁迫带来不利影响,并在昆虫的免疫信号转导中发挥重要作用(Schwarz, 1996; Bogdan *et al*., 2000)。然而,大量的 ROS 积累会对生物体内的蛋白质、核酸和脂质造成氧化损伤(Martindale and Holbrook, 2002),影响基因组的稳定性(Dizdaroglu and Jaruga, 2012),进而损伤细胞功能和改变细胞膜的物化特征(Rikans and Hornbrook, 1997; Barata *et al*., 2005)。因此,快速清除过量的 ROS 对昆虫细胞功能的正常运行和存活至关重要。

为维持体内 ROS 平衡和降低 ROS 对细胞成分的氧化损伤,昆虫进化出一套复杂的抗氧化系统,包括大量的非酶类分子(谷胱甘肽、维生素 A、C、E 和黄酮类化合物)和抗氧化酶,抗氧化酶包括过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和谷胱甘肽转移酶(GST)等(Martindale and Holbrook, 2002)。其中,CAT 是一类广泛存在于动物、植物和微生物中的抗氧化酶。在昆虫中,CAT 首次在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 中被发现(Orr *et al*., 1990),而后在鳞翅目(Lepidoptera)(Yamamoto *et al*., 2005; 胡振等, 2011; Wang *et al*., 2012; Xu *et al*., 2016; Lu *et al*., 2017)、鞘翅目(Coleoptera)(Krishnan *et al*., 2007; Kim *et al*., 2008)、直翅目(Orthoptera)(Zhang *et al*., 2016)和缨翅目(Thysanoptera)(Qin *et al*., 2017)昆虫中被报道,并证实了 CAT 的主要作用是将过氧化氢分解成 H_2O 和 O_2,维持细胞内氧化还原反应的平衡(Klichko *et al*., 2004; Kim *et al*., 2008),从而避免和减少外界环境胁迫造成的伤害。此外,研究发现 CAT 还能介导昆虫对病原菌的免疫和胁迫应答(Molina-Cruz *et al*., 2008; Ayinampudi *et al*., 2015),参与调控昆虫的生殖(DeJong *et al*., 2007; Diaz-Albiter *et al*., 2011),并与昆虫细胞的发育与衰老紧密相关(Kregela and Zhang, 2007; Zhao *et al*., 2013)。鉴于其在昆虫生命活动中的重要性,CAT 被认为是未来杀虫剂和植物次生代谢物的一个新的分子靶标(Zhao *et al*., 2013),具有重要的实际运用价值。

粘虫 *Mythimna separata* 是一种典型的迁飞性害虫,近年来在我国北方玉米上经常暴发,对我国玉米安全生产造成了严重的威胁(张云慧等, 2012)。目前,生产上主要利用杀虫剂来防治该害虫,但杀虫剂的大量使用不仅会导致粘虫抗性的产生(江幸福等, 2014),而且杀伤天敌和污染环境,对粘虫过氧化氢酶的抑制可能成为防治该害虫的新方法和新途径。最近的研究发现,苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis* (Bt)(解娜, 2012)、UV-A 辐射(Ali *et al*., 2017a)和高温(Ali *et al*., 2017b)处理后粘虫体内 CAT 活性显著升高,表明 CAT 在粘虫抵御这 3 种胁迫中发挥重要作用。但这些研究仅从酶活性水平阐释了粘虫 CAT 在环境胁迫下的保护机制,缺乏基因转录水平的研究。为此,本实验采用 RT-PCR 结合 RACE 的方法克隆了粘虫的 CAT 基因,对其 cDNA 和 DNA 序列进行了分析,并采用实时荧光定量 PCR(qPCR)研究了该基因在粘虫不同发育时期、幼虫不同组织以及不同密度、温度和毒死蜱胁迫下的表达谱,以期为深入了解该基因在粘虫发育及抗氧化胁迫中的作用奠定基础,最终为粘虫防治提供潜在的分子靶标。

1　材料与方法

1.1　供试虫源及试剂

供式虫源:实验中所用粘虫于 2014 年采自贵州省黔西县素朴镇(27°01′39.72″N,106°20′2.92″E),带回室内后在光周期 16L: 8D、温度 24 ~25℃、相对湿度 70% ~80% 的条件下饲养。具体饲养方法为:1 龄幼虫孵化后,利用新鲜的玉米叶饲养,定期更换叶片,直到取食停止。幼虫老熟后,提供湿度为 10% ~20% 的抽纸供其化蛹。羽化成虫进行配对后置于养虫笼内,提供稻草杆供其产卵,同时提供 10% ~20% (w/v)蜂蜜水补充营养。

供试试剂:总 RNA 提取试剂盒(型号:Z3100)和 pGEM-T easy 载体购自 Promega 公司;胶回收试剂盒购自 Omega 公司; RACE 试剂盒、Taq 酶, DL2000 DNA Marker 和 DH5α 均购自 TaKaRa 公司; cDNA 第 1 链反转录试剂盒购自 Thermo Fisher 公司;荧光定量试剂盒购自 Bio-Rad 公司;基因组提取试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司。所有引物由上海生物工程有限公司合成。

1.2　样品的处理和收集

粘虫不同发育阶段样品包括卵、1 -6 龄幼虫、蛹和成虫。粘虫不同组织样品取自 5 龄幼虫,包括头部、表皮、前肠、中肠、后肠和马氏管。其中卵约 100 粒,1 龄幼虫 20 头,2 龄幼虫 10 头,3 -6 龄幼虫、蛹和成虫各 3 头作为一个重复;从 3 头 5 龄幼虫解剖而得的各组织作为一个重复。

不同温度处理:将发育整齐的 3 龄幼虫按每处理 20 头置于含有新鲜玉米叶的 100 mL 养虫盒中,用纱布封口,然后暴露于 25(对照), 31, 33, 35, 37 和 39℃下,2 h 后收集样品。每处理取 3 头幼虫作为一个重复,用于 qPCR 实验。

不同毒死蜱浓度处理:将新鲜的玉米叶片剪成条形,在 0(以清水为对照), 1, 2, 4 和 8 μg/mL 的毒死蜱中浸泡 10 s,然后置于报纸上。待药液晾干后,将叶片放入培养皿中,接入 12 头 3 龄幼虫,饲养于上述条件下。24 h 后观察死亡情况,并收集存活个体。每处理取 3 头幼虫作为一个重复,用于 qPCR 实验。

不同幼虫密度处理:将刚孵化的 1 龄幼虫按 1, 5, 10, 20, 30 头的密度饲养于 1 050 mL 透明塑料瓶中,饲养方法同 1.1 节。待幼虫发育至 5 龄时收集样品。每处理取 3 头幼虫作为一个重复,用于 qPCR 实验。

上述样品收集完毕后,用液氮速冻,保存于 -80℃下,用于总 RNA 的提取。每个处理设 3 个重复。

1.3　总 RNA 提取及 cDNA 第 1 链合成

总 RNA 样品来自单头粘虫成虫,提取方法按照 SV Total RNA Isolation Kit 进行。利用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性,采用核酸蛋白测定仪检测 RNA 的浓度和纯度,存于 -80℃ 备用。cDNA 第 1 链的合成采用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 进行。以 1 μg 的总 RNA 为模板,利用反转录酶和 oligo dT 引物合成第 1 链,存于 -20℃下备用。

1.4　粘虫 *CAT* 中间片段的克隆

根据已报道的粘虫近缘种 *CAT* 保守区域设计一对简并引物(表 1),以 1.3 节中反转录 cDNA 为模板,采用 rTaq 酶进行 RT-PCR 扩增,反应体系:10 × *Ex*Taq Buffer 2.5 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μL,上下游引物(10 mmol/L)各 1 μL, Taq 酶 0.125 μL, ddH_2O 17.375 μL。PCR 参数:94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 65 ~45℃ 30 s(每个循环降 1℃), 72℃ 30 s, 共 19 个循环;之后 94℃ 30 s, 45℃ 30 s, 72℃ 1 min,共 25 个循环;最后在 72℃下

延伸 10 min。PCR 产物采用 1.5% 的琼脂糖凝胶进行电泳,而后对目标产物进行回收纯化。将回收产物连接至 pGEM-T easy 载体上进行 TA 克隆,转化到感受态细胞中。然后进行经蓝白斑筛选,挑取白斑扩大培养,经菌液 PCR 鉴定为阳性后,送上海生物工程股份有限公司测序。

表 1　实验中所用的引物

Table 1　Primers used in the experiments

引物 Primers	方向 Direction	引物序列(5′-3′) Primer sequences	产物大小(bp) Product size	退火温度(℃) Annealing temperature	引物用途 Use of primers
DP-CAT	F	GAAGTRACYCAYGACATCAC	1 308		中间片段扩增
	R	CTTGAALGTRTGGAACCAT			Amplification of the intermediate fragment
CAT-5	R	GGTCACGGACTGTGTCAGCAGAGCC	1 080	68	5′末端扩增 5′ RACE
CAT-3	F	AAATTCCCAGTGAACTGCCCCTACCG	657	68	3′末端扩增 3′ RACE
CAT-J	F	CGCTCCGTTTCATTGACAACA	2 208		基因组扩增
	R	AAAGTAGCACCCAAAGTTCCT			Genome amplification
CAT	F	TGCAGGGCCGTTTATTCTCAT	168	54.3	实时荧光定量 PCR
	R	GAGTTGGGGAAGTAGTTGGGG			Real-time PCR
RPS7	F	CGCCAACAAACAGAAGAGGC	219	55.5	
	R	CGCCCCGTAAGCTTCTTGTA			
RPS13	F	ACTGACTGCTGATGATGTGAAGG	77	57.5	
	R	TGACACCGATTTGGGAGGG			
ACTIN	F	AACTTCCCGACGGTCAAGTCAT	168	60	
	R	TGTTGGCGTACAAGTCCTTACG			
TUB	F	CGGTAATGCCTGCTGGGAA	118	54.3	
	R	CTCGCTGAAGAAGGTGTTGAA			

1.5　粘虫 *CAT* 末端序列的 RACE 扩增

根据获得的 *CAT* 中间片段信息,设计特异性引物 CAT-5 和 CAT-3(表 1),以 SMARTER RACE 5′/3′ Kit 合成的 cDNA 为模板,分别进行 5′和 3′扩增。PCR 参数:94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 68℃ 30 s, 72℃ 3 min, 共 35 个循环;最后 72℃ 下延伸 10 min。PCR 产物回收纯化后,按照上述 1.4 节的方法进行克隆测序。

1.6　粘虫 *CAT* 的 DNA 序列分析

粘虫基因组 DNA 来自单头成虫,提取按照 Transgen DNA Extraction Kit 提供的方法进行,存于 -20℃下备用。根据 *CAT* 的全长 cDNA 序列,设计一对跨越开放阅读框的特异性引物(表 1),以粘虫的 DNA 为模板,进行 RT-PCR 扩增,PCR 参数同 1.4 节。对获得 PCR 产物进行纯化,克隆和测序。采用 Clustalx 对粘虫 *CAT* 的 DNA 序列与 cDNA 序列进行比对,从而获得粘虫 *CAT* 的 DNA 序列结构特征。为了比较粘虫与其他物种 *CAT* 的 DNA 序列,从 NCBI(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/)下载已报道的黑腹果蝇 *D. melanogaster* 和二化螟 *Chilo suppressalis CAT* 的 DNA 序列进行内含子与外显子数量、大小和插入位置的比较分析。

1.7　粘虫 *CAT* 表达谱的 qPCR 分析

不同处理样品的总 RNA 提取按照 1.3 节中的方法进行,并采用 iScriptcDNA Synthesis Kit (Bio-Rad)进行 RNA 的反转录,于 -20℃下保存备用。实时荧光定量 PCR 的体系:SsoAdvanced™ Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad) 10 μL,上下游引物各 1 μL(表 1),模板 cDNA 1 μL, ddH_2O 7 μL。PCR 反应参数:95℃预变性 3 min;95℃变性 15 s,退火温度下 30 s,共 35 个循环;反应结束后,制作溶解曲线判定引物的特异性。反应中以 ddH_2O 作为阴性对照,以 *ACTIN*(GenBank 登录号: GQ856238), *TUB* (GenBank 登录号: EU100016), *RPS13* (GenBank 登录号: GQ222274)和 *RPS7*(GenBank 登录号: AB669190)分别作为不同发育阶段、不同组织及不同密度,不同温度和不同毒死蜱浓度处理的内参基因对数据进行校正(表 1)(另文发表)。每个处理设 3 个生物学重复,每个生物学重复设 3 个技术重复。

1.8　数据分析

利用 ContigExpress 软件对获得的 *CAT* 片段进行拼接,以获得全长 cDNA 序列。采用 ORF Finder (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/)鉴定

CAT 的开放阅读框；采用 ExPASy（http：// www.expasy.org/）鉴定等电点和蛋白分子量及蛋白结构域；采用 Mega5.0，基于邻接法构建 CAT 的进化树，各分支重复检验次数均为 1 000 次。

采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 CAT 基因的表达量，之后采用 One-way ANOVA 进行不同处理间的差异显著性分析，并采用 HSD 法进行多重比较分析。所有统计过程在 DPS 软件（Tang and Zhang，2013）中完成。

2 结果

2.1 粘虫 *CAT* 的克隆与序列分析

将测序获得的 1 308 bp 基因片段在 NCBI 中进行 Blast 分析，结果显示该基因为 CAT 家族基因。根据该基因序列，分别在 5′和 3′端设计一条特异性引物（表 1），以粘虫的 5′和 3′ cDNA 为模板，经 RT-PCR 扩增后分别获得了约 1 080 和 650 bp 的条带。经测序后与中间片段进行拼接，获得了粘虫 *CAT* 的全长 cDNA 序列，并命名为 *MsCAT*（图 1）。该基因 cDNA 序列全长 1 846 bp（GenBank 登录号：MF737386），开放阅读框为 1 602 bp，编码 533 个氨基酸，编码蛋白的分子量为 61.77 kD，等电点为 6.77。采用 Prosite Scan 分析发现，*MsCAT* 具有 3 个接触反应氨基酸，即 His-99，Asn-173 和 Tyr-382；此外，MsCAT 还具有 CAT 家族典型的 3 个结构域：即一个长达 18 个氨基酸的基部活化位点标签（[88]FDRERIPERVVHAKGAGA[105]），一个 NADPH 结合位点（[216]VTHQVLYLFGD[226]）和一个亚铁血红蛋白

```
1     ATGGGATTTTGTGCTCGCGGTACGCGTCCAGTGCGCCGCTCCGTTTCATTGACAACAAACGCTTACAACCAATCCAAAATGGCTTCAAGG
1     M  G  F  C  A  R  G  T  R  P  V  R  R  S  V  S  L  T  T  N  A  Y  N  Q  S  K  M  A  S  R
91    GAACCTGCCACTGACCAGCTTGTCAATTTCAAGAAAACTCTTAAAGATTCTCCCGGCTACATCACTACAAGGACTGGAGCACCTGTTGGA
31    E  P  A  T  D  Q  L  V  N  F  K  K  T  L  K  D  S  P  G  Y  I  T  T  R  T  G  A  P  V  G
181   GCTGTAACTGCTATTCAAACTGTTGGAAAGAATGGCCCAGCTCTGCTGCAAGATGTCAACTTCCTCGACCTGATCTCTTCTTTTGACCGA
61    A  V  T  A  I  Q  T  V  G  K  N  G  P  A  L  L  Q  D  V  N  F  L  D  L  I  S  S  F  D  R
271   GAGCGTATTCCAGAGCGCGTTGTGCATGCTAAAGGTGCCGGAGCATTCGGACATTTTGAAGTGACTCATGACATCACAAAATACTGTGCT
91    E  R  I  P  E  R  V  V  H  A  K  G  A  G  A  F  G  H  F  E  V  T  H  D  I  T  K  Y  C  A
361   GCCAAAGTCTTTGAAACAGTTGGAAAGGTTACACCAATAGCTGTGAGATTCTCTACTGTTGGTGGCGAGAGTGGCTCTGCTGACACAGTCC
121   A  K  V  F  E  T  V  G  K  V  T  P  I  A  V  R  F  S  T  V  G  G  E  S  G  S  A  D  T  V
451   GTGACCCTAGAGGGTTTGCTGTAAAGTTCTACACTGATGATGGTAACTGGGACCTTGTTGGTAATAACACACCTATTTTCTTCATCAGG
151   R  D  P  R  G  F  A  V  K  F Y  T  D  D  G  N  W  D  L  V  G  N  N  T  P  I  F  F  I  R
541   GATCCTACTTTGTTCCCTAGTTTTATTCATACTCAGAAGAGGAACCCTGCCACTCATCTTAAGGATCCTGACATGTTCTGGGACTTCATC
181   D  P  T  L  F  P  S  F  I  H  T  Q  K  R  N  P  A  T  H  L  K  D  P  D  M  F  W  D  F  I
631   ACATTGAGGCCAGAGGTAACACATCAGGTGTTATACTTGTTTGGTGATCGTGGTATTCCTGATGGTTACAGGCATATGAACGGATACGGA
211   T  L  R  P  E  V  T  H  Q  V  L  Y  L  F  G  D  R  G  I  P  D  G  Y  R  H  M  N  G  Y  G
721   TCTCACACCTTCAAGCTTATTAATGCTCAAGGTGTGGCACACTGGGTGAAATTCCATTACAAGACCAACCAGGGAATTAAGAACTTGCCA
241   S  H  T  F  K  L  I  N  A  Q  G  V  A  H  W  V  K  F  H  Y  K  T  N  Q  G  I  K  N  L  P
811   GTTGATAAGGCTGGTGAGCTGGCATCTACTGACCCTGACTATTCTATTAGAGACCTTTACAATGCTATTGCCAAGGGTGAGTTCCCAACA
271   V  D  K  A  G  E  L  A  S  T D  P  D  Y  S  I  R  D  L  Y  N  A  I  A  K  G  E  F  P  T
901   TGGACAATGTACATCCAAGTCATGACAATGGCTCAAGCAGAGAGCAGCAAGTTCAATCCATTTGATTTGACCAAGATTTGGCCCCATGCG
301   W  T  M  Y  I  Q  V  M  T  M  A  Q  A  E  S  S  K  F  N  P  F  D  L  T  K  I  W  P  H  A
991   GATTACCCTCTAATTGAAGTTGGCAAACTTGTCTTAAACAGAAACCCTAAGAACTACTTTGCTGAAGTTGAACAGCTTGCATTCAGTCCT
331   D  Y  P  L  I  E  V  G  K  L  V  L  N  R  N  P  K  N  Y  F  A  E  V  E  Q  L  A  F  S  P
1081  GCTAATCTGGTGCCAGGTATTGAGCCATCTCCTGACAAGATGTTGCAGGGCCGTTTATTCTCATATAGCGACACTCATCGTCACCGCCTA
361   A  N  L  V  P  G  I  E  P  S  P  D  K  M  L  Q  G  R  L  F  S  Y  S  D  T  H  R  H  R  L
1171  GGAGCTAACTACTTGCAAATCCCAGTGAACTGCCCCTACCGCGTCACCGTGGCTAACTACCAGCGTGATGGACCACAAACTATCAACAAC
391   G  A  N  Y  L  Q  I  P  V  N  C  P  Y  R  V  T  V  A  N  Y  Q  R  D  G  P  Q  T  I  N  N
1261  CAGGATGGATGCCCCAACTACTTCCCCAACTCCTTCTCAGGCCCACAAGAGTGCCCACGAGCACAGCGCCTGCAGCCCAGGTACAATGTC
421   Q  D  G  C  P  N  Y  F  P  N  S  F  S  G  P  Q  E  C  P  R  A  Q  R  L  Q  P  R  Y  N  V
1351  AGCGGAGACGTTGACAGGTTTGATTCTGGCCAGACCGAGGACAACTTCTCTCAAGCTACAGAGCTCTACAAGAAGGTATTCGATGATGGC
451   S  G  D  V  D  R  F  D  S  G  Q  T  E  D  N  F  S  Q  A  T  E  L  Y  K  K  V  F  D  D  G
1441  GCCAAACAGCGCGTTGTTGAGAACATTGTGGGTCACTTGAAGGACGCTGCTGGCTTCATTCAAGAACGAGCCATCAAGATGTTCACCCAG
481   A  K  Q  R  V  V  E  N  I  V  G  H  L  K  D  A  A  G  F  I  Q  E  R  A  I  K  M  F  T  Q
1531  GTACATCCTGATCTAGGCAGCAAGATTGCTGCTGGCTTGGCTCCATACAAGAAATATCACGCCAATTTGTAATTTAATATAAGGAACTTT
511   V  H  P  D  L  G  S  K  I  A  A  G  L  A  P  Y  K  K  Y  H  A  N  L
1621  GTTTAATATAAGGAACTTTGGGTGCTACTTTTATATTAGATACTAAGCAACAAGATTATATTATCTTTTGGGTATACTTGGGTCTATATG
1701  AAGTATGAAGATCATGGTACATGAATTCCAATTTTTGAACACTTAAGGTGATTTACAATGAATATTGCATAATAAAACTGACTGTTTATC
1791  TGATAATATTGTTTAAAATATACTACTTTGTAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1846
```

图 1 粘虫 *MsCAT* 的核苷酸及推导的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *MsCAT* in *Mythimna separata*

起始密码子（ATG）和终止密码子（TAA）用斜体和加粗标记，3 个接触反应氨基酸（His-99，Asn-173 和 Tyr-382）用黑色加粗标记，CAT 基部活化位点标签（FDRERIPERVVHAKGAGA），NADPH 结合位点（VTHQVLYLFGD）和亚铁血红素结合位点（RLFSYSDTH）用方框标记。Italic and bold nucleotides indicate the start codon（ATG）and stop codon（TAA），respectively. Three catalytic amino acids（His-99，Asn-173 and Tyr-382）are shaded by bold black. The CAT proximal active site signature（FDRERIPERVVHAKGAGA），NADPH binding site（VTHQVLYLFGD）and proximal heme-ligand signature sequence（RLFSYSDTH）in the predicted amino acid sequence are outlined by rectangles.

结合位点([379] RLFSYSDTH[386])(Nair *et al*., 2011)。

2.2 *MsCAT* 的 DNA 序列分析

经 RT-PCR 和测序获得了 *MsCAT* 的 DNA 序列，长度为 2 208 bp。将 *MsCAT* 的 DNA 序列与 cDNA 序列比对分析发现，*MsCAT* 的 DNA 序列在 5′端第 99 bp 处插入一个长为 612 bp 的内含子(图 2)，该内含子结构符合经典的 GC-AG 原则。与二化螟 *C. suppressalis* 和黑腹果蝇 *D. melanogaster* *CAT* 的 DNA 序列的比较分析发现，在内含子的插入位置和大小方面均存在差异。二化螟和黑腹果蝇 *CAT* 的 DNA 序列均在 5′端 57 bp 处插入一个内含子，大小分别为 1 023 和 3 520 bp。此外，黑腹果蝇 *CAT* 的 DNA 序列在 978 bp 处插入一个长为 96 bp 的内含子。

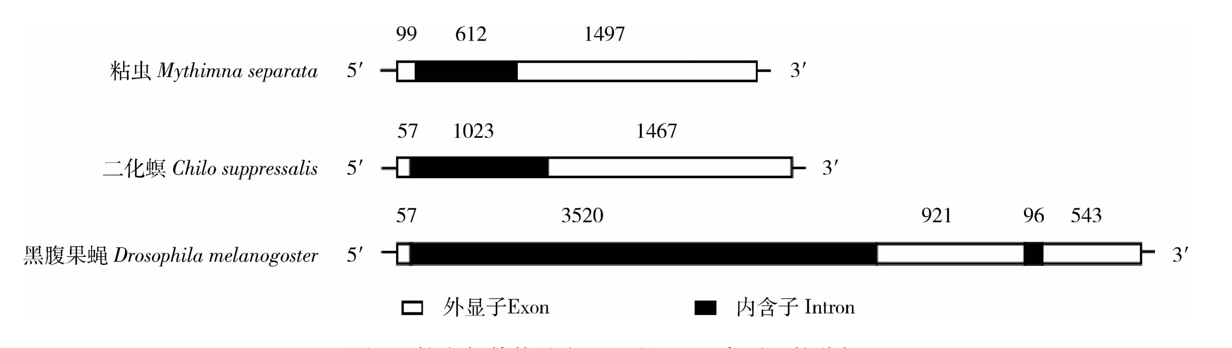


图 2 粘虫与其他昆虫 *CAT* 的 DNA 序列比较分析

Fig. 2 Comparison of the DNA sequence of *CAT* between *Mythimna separata* and other insects

图中白色方框代表外显子，黑色方框代表内含子，方框上的数字代表内含子和外显子的长度(bp)。White rectangles indicate exons, black rectangles represent introns, and the numbers above rectangles indicate the size (bp) of exon and intron.

2.3 MsCAT 序列比对和进化分析

将 MsCAT 氨基酸序列与其他鳞翅目的 CAT 氨基酸序列进行比对分析发现，鳞翅目昆虫 CAT 比较保守。其中 MsCAT 与棉铃虫 *Helicoverpa armigera* CAT 序列的相似性最高，氨基酸序列一致性达 89%；与甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* CAT 序列的氨基酸序列一致性为 87%，与斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*、金凤蝶 *Papilio machaon*、柑橘凤蝶 *Papilio polytes* 和家蚕 *Bombyx mori* CAT 序列的氨基酸序列一致性均为 86%。为研究 MsCAT 与其他物种之间的进化关系，采用 MEGA5.1 中的邻接法构建了系统进化树。结果表明，该进化树被明显分为 2 个分支，即鳞翅目和双翅目。在鳞翅目中，粘虫与同为夜蛾科(Noctuidae)的棉铃虫、甜菜夜蛾和斜纹夜蛾亲缘关系最近，这与基于形态学的亲缘关系结果相一致(图 3)。

2.4 *MsCAT* 的表达谱分析

由图 4(A)可知，*MsCAT* 在粘虫各发育阶段表达的表达量差异显著，其中卵期的表达量较低，幼虫期表达量有不同程度的上调，在 6 龄幼虫期表达量最高，在蛹和成虫阶段的表达量明显下调，并与卵期无显著差异(图 4：A)。*MsCAT* 在 5 龄幼虫不同组织中的表达差异显著，其在头部中的表达量最低，在表皮，前肠和中肠中的表达量显著上调，而在后肠和马氏管中的表达显著下调，并与头部中表达量无显著差异(图 4：B)。

不同浓度的毒死蜱处理对 *MsCAT* 的表达具有显著影响。粘虫 3 龄幼虫取食经 1 μg/mL 毒死蜱处理的玉米叶片后，其表达量显著上调，随着浓度的增加表达量又显著下调，并与对照无显著差异(图 5：A)。高温对 *MsCAT* 的表达具有显著影响。在 31℃下，*MsCAT* 的表达量显著低于对照，随温度的升高其表达显著上调，至 39℃ 又开始下调，并与对照无显著差异(图 5：B)。幼虫饲养密度对 *MsCAT* 的表达具有显著影响。总体而言，饲养密度的增加明显抑制 *MsCAT* 的表达(图 5：C)。

3 讨论

由于昆虫缺少依赖于硒的谷胱甘肽过氧化物酶，因而只能依靠 CAT 清除体内的 H_2O_2(Yamamoto *et al*., 2005)。作为抗氧化系统重要的组成成分，CAT 在众多昆虫物种中得到研究，但在粘虫中还未见报道。本研究通过 RT-PCR 和 RACE 技术从粘虫中克隆到了一个 CAT 基因，命名为 *MsCAT*。粘虫的 *MsCAT* 的 cDNA 序列全长 1 846 bp，开放阅读框为 1 602 bp，编码 533 个氨基酸，预测的分子量为 61.77 kD，这与二化螟 CAT 的分子量(62.06 kD)十

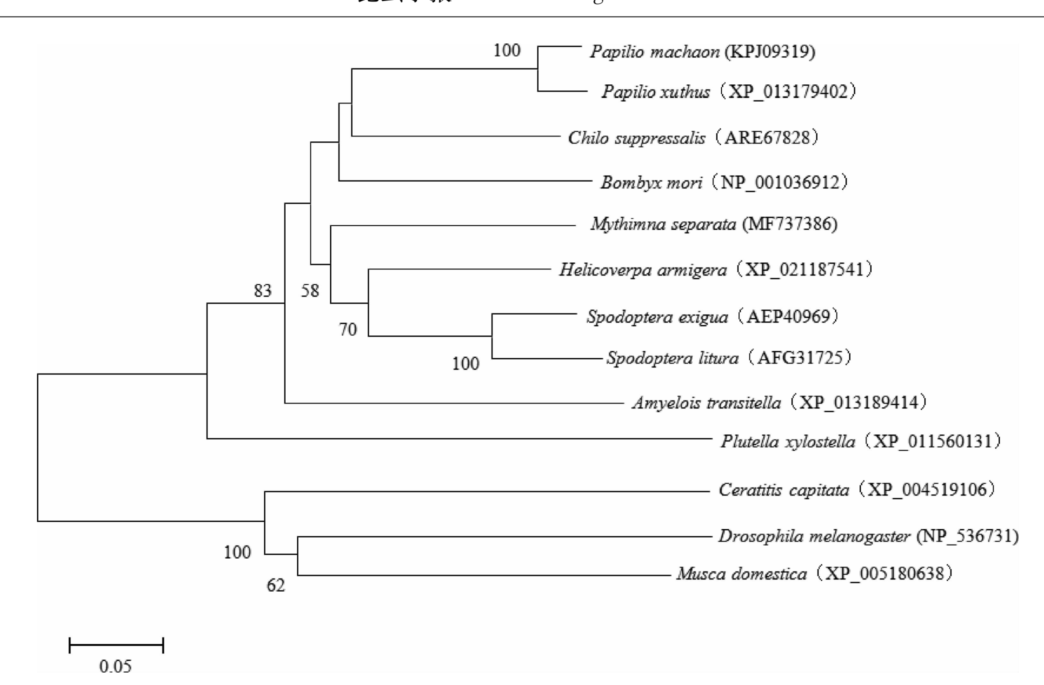


图 3　基于 CAT 氨基酸序列构建的粘虫与其他昆虫进化树(邻接法)

Fig. 3　Phylogenetic tree based on amino acid sequences of CAT proteins from *Mythimna separata* and other insect species (neighbor-joining method)

种名后括号内编号为对应种 CAT 的 GenBank 登录号。图中进化树节点数字代表自展 1 000 次重复检验百分比值,且图中只显示大于 50% 的自展检验百分比。Number in brackets following a species name is the GenBank accession number of CAT protein of the corresponding species. The test of phylogeny was carried out using a bootstrap analysis of 1 000 replications, and only the bootstrap value above 50% are shown on each node of the tree.

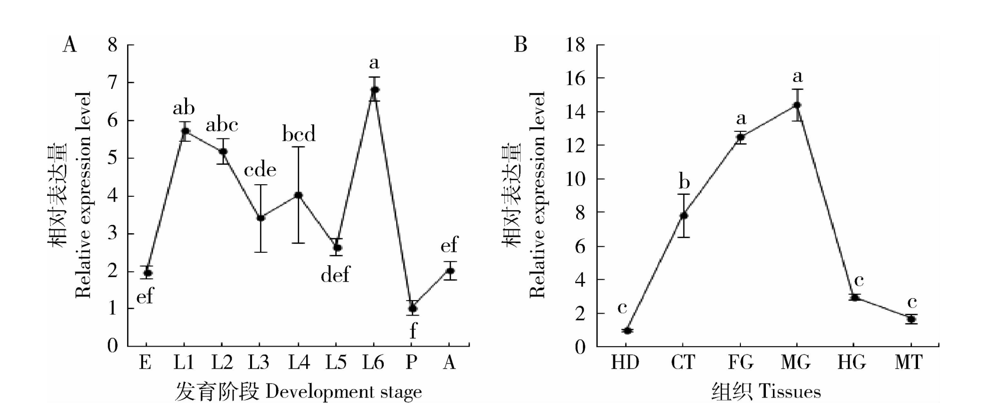


图 4　*MsCAT* 在粘虫不同发育阶段(A)和 5 龄幼虫组织(B)中的相对表达量

Fig. 4　Relative expression levels of *MsCAT* in different developmental stages (A) and tissues of the 5th instar larva (B) of *Mythimna separata*

E: 卵 Egg; L1 - L6: 分别为 1 - 6 龄幼虫 1st - 6th instar larva, respectively; P: 蛹 Pupa; A: 成虫 Adult; HD: 头 Head; CT: 表皮 Cuticle; FG: 前肠 Foregut; MG: 中肠 Midgut; HG: 后肠 Hindgut; MT: 马氏管 Malpighian tubules. 柱上不同小写字母表示经 HSD 法检验各处理间差异显著($P \leqslant 0.05$)。Different lowercase letters indicate significant differences among treatments by HSD test ($P \leqslant 0.05$).

分相近(Lu *et al*., 2017)。*MsCAT* 推导的氨基酸序列与棉铃虫、甜菜夜蛾、斜纹夜蛾、金凤蝶、柑橘凤蝶和家蚕的 CAT 相似性较高;CAT 蛋白家族 3 个高度保守的结构域 FDRERIPERVVHAKGAGA, RLFAYPDTH 和 VTHQVLYLFGD(Nair *et al*., 2011)也在 MsCAT 中被发现;此外,系统进化树分析显示 MsCAT 也与夜蛾科的棉铃虫、甜菜夜蛾、斜纹夜蛾的亲缘关系最近。这些结果表明,本研究获得的 *MsCAT* 属于已报道的 *CAT* 家族,可能具有其他昆虫 *CAT* 相似的功能。

定量检测 *MsCAT* 在不同发育阶段和组织中的表达模式有助于理解其在粘虫生长发育过程中的生

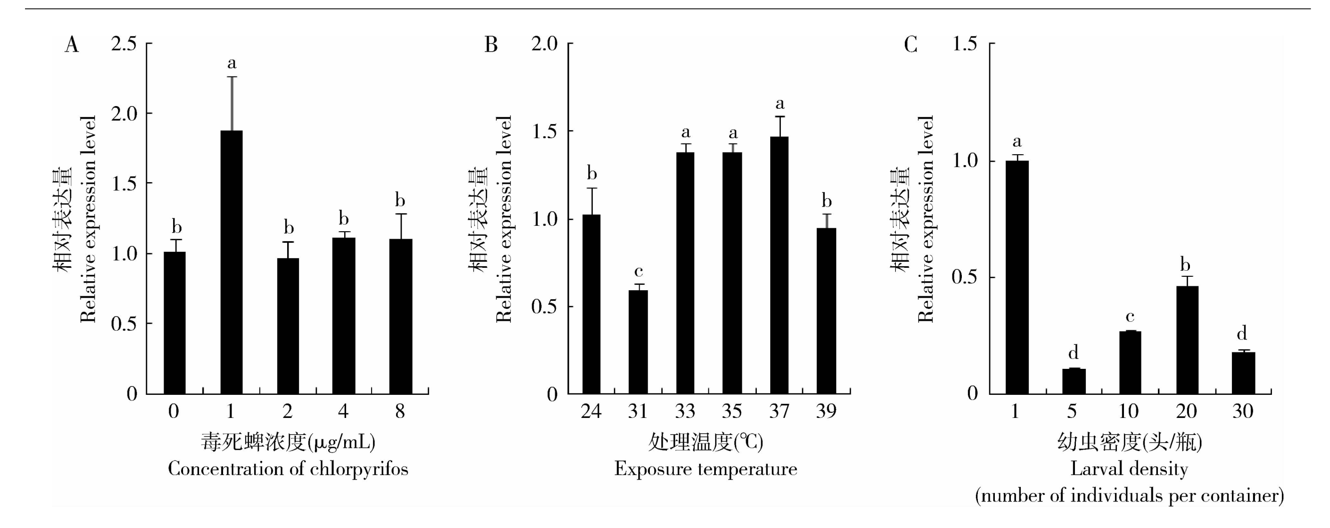


图 5　毒死蜱(A)、高温(B)和幼虫密度(C)胁迫下 *MsCAT* 的相对表达量

Fig. 5　Relative expression levels of *MsCAT* under chlorpyrifos (A), high temperature (B) and larval crowding (C) stress

A：3 龄幼虫经不同浓度毒死蜱处理 24 h 后的 *MsCAT* 表达量 The expression level of *MsCAT* in the 3rd instar larvae after exposure to different concentrations of chlorpyrifos for 24 h；B：3 龄幼虫在高温胁迫下处理 2 h 后 *MsCAT* 的表达量 The expression level of *MsCAT* in the 3rd instar larvae after exposure to high temperature stress for 2 h；C：按不同密度饲养的 5 龄幼虫的 *MsCAT* 表达量 The expression level of *MsCAT* in the 5th instar larvae reared under different densities. 柱上不同小写字母表示经 HSD 法检验各处理间差异显著($P \leqslant 0.05$)。Different lowercase letters above bars indicate significant differences among treatments by HSD test ($P \leqslant 0.05$).

理作用。本研究表明，*MsCAT* 在粘虫所有发育阶段和 5 龄幼虫所有组织中均表达，这与在果蝇(Klichko *et al.*, 2004)、家蚕(Yamamoto *et al.*, 2005)、甜菜夜蛾(胡振等，2013)、二化螟(Lu *et al.*, 2017)中报道的结果一致。*MsCAT* 在幼虫期表达量较高，而在卵、蛹和成虫的表达量较低，这表明 *MsCAT* 在阻止粘虫幼虫发育过程中所产生的氧化损伤方面可能发挥重要作用。此外，本研究还发现 *MsCAT* 在 5 龄粘虫的中肠中表达量最高，而在其他组织中表达量相对较低，与家蚕(Yamamoto *et al.*, 2005)、斜纹夜蛾(胡振等，2013)、飞蝗 *Locusta migratoria*(Zhang *et al.*, 2016)和二化螟(Lu *et al.*, 2017)中报道的结果不一致。中肠是昆虫吸收和消化食物的场所，同时也是病原微生物、农药和各种毒素作用的靶标。粘虫 5 龄幼虫是生长发育最快的时期，需要取食大量的寄主植物，在取食大量寄主植物的同时也将其中大量的次生物质运输至中肠，对中肠造成潜在伤害。有研究表明海灰翅夜蛾 *Spodoptera littoralis* 取食番茄叶片后其体内 CAT 活力显著提高(Krishnan and Kodrik, 2006)，取食植物酚后导致前肠 ROS 含量增加，进而诱导中肠内包括 CAT 在内抗氧化酶活力提高(Krishnan *et al.*, 2007)；最近，Zhang 等(2016)研究发现，飞蝗取食次生代谢物槲皮素能显著诱导其体内 *CAT* 的转录水平显著提高。因此，我们推测粘虫可能通过提高 *MsCAT* 的表达以消除或减轻这些有毒物质引起的氧化损伤，从而维持体内 ROS 的平衡。

为明确 *MsCAT* 在抵御氧化胁迫中的作用，本研究进一步检测了毒死蜱、高温和幼虫密度胁迫下 *MsCAT* 的表达谱。结果表明，低浓度的毒死蜱能刺激 *MsCAT* 上调表达，而高浓度的毒死蜱则抑制 *MsCAT* 的表达，这说明 *MsCAT* 能够有效抵御由亚致死剂量毒死蜱造成的氧化胁迫并清除多余的 ROS，而高浓度的毒死蜱造成了氧化损伤和产生大量的 ROS，超出了 *MsCAT* 的清除能力。

昆虫生长发育和繁殖需要适宜的温度范围，超出这个范围的温度则变成了一种环境胁迫。已有的研究表明高温能够诱导产生氧化胁迫，诱导包括 CAT 在内的昆虫抗氧化酶的上调表达(冯从经等，2001；王梦龙等，2014)。本研究结果表明，*MsCAT* 在 31℃下的表达量显著低于对照，在 33～37℃范围内明显上调表达，在 39℃下 *MsCAT* 的表达又开始下调，这与在西花蓟马 *Frankliniella occidentalis*(Qin *et al.*, 2016)和二化螟(Qin *et al.*, 2016；Lu *et al.*, 2017)中的研究结果一致。这些结果表明，粘虫的氧化胁迫反应可以应对一定的高温，而不能处理过高的温度。

以往的研究大多关注外界环境因子诱导的氧化胁迫反应，而有关昆虫内在因子，如种群密度对氧化胁迫反应的诱导未见报道。本研究结果表明幼虫饲

养密度增加明显抑制了 *MsCAT* 的表达,说明密度增加可能对粘虫造成了氧化损伤,这与在大菱鲆 *Scophthalmus maximus* 中报道的结果相一致(Liu *et al*., 2016)。已有的研究表明,饲养密度增加能够诱导昆虫体内热激蛋白的上调表达(Wang *et al*., 2007; Chapuis *et al*., 2011)。同为胁迫诱导表达的基因为何其表达模式出现相反的模式? 目前还没有相关的研究报道。我们推测在高密度胁迫条件下昆虫主要通过热激蛋白的上调表达来抵御密度胁迫造成的伤害,而 CAT 在此过程中发挥的作用有限。此外,DeJong 等(2007)通过 RNAi 的方法沉默冈比亚疟蚊 *Anopheles gambiae* CAT 基因后发现,*CAT* 表达量显著降低的同时其产卵量也显著减少,这表明 CAT 基因在冈比亚疟蚊生殖过程中发挥重要作用。罗礼智等(1995)报道随粘虫饲养密度的增加,其羽化成虫的产卵量显著下降。因此,我们推测在高密度条件下 *MsCAT* 下调可能是粘虫产卵量的下降的一个重要原因,但需要进一步的研究来证实。

总之,本研究结果将有助于进一步理解 *MsCAT* 的生理功能,为研制以 CAT 作为靶标的新型氧化酶抑制剂来控制粘虫奠定基础。

参考文献 (References)

Ali A, Rashid MA, Huang QY, Lei CL, 2017a. Influence of UV-A radiation on oxidative stress and antioxidant enzymes in *Mythimna separata* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environ. Sci. Pollut. Res. Int*., 24(9): 8392 - 8398.

Ali A, Rashid MA, Huang QY, Wong C, Lei CL, 2017b. Response of antioxidant enzymes in *Mythimna separata* (Lepidoptera: Noctuidae) exposed to thermal stress. *Bull. Entomol. Res*., 107(3): 382 - 390.

An MI, Choi CY, 2010. Activity of antioxidant enzymes and physiological responses in arkshell, *Scapharca broughtonii*, exposed to thermal and osmotic stress: effects on hemolymph and biochemical parameters. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 155(1): 34 - 42.

Ayinampudi P, Chaitanya RK, Chauhan VK, Dasgupta A, Dutta-Gupta A, 2015. Differential oxidative stress responses in castor semilooper, *Achaea janata*. *J. Invertebr. Pathol*., 132: 157 - 164.

Barata C, Varo I, Navarro JC, Arun S, Porte C, 2005. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 140(2): 175 - 186.

Bogdan C, Röllinghoff M, Diefenbach A, 2000. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr. Opin. Immunol*., 12(1): 64 - 76.

Chapuis MP, Simpson SJ, Blondin L, Sword GA, 2011. Taxa-specific heat shock proteins are over-expressed with crowding in the Australian plague locust. *J. Insect Physiol*., 57(11): 1562 - 1567.

DeJong RJ, Miller L M, Molina-Cruz A, Gupta L, Kumar S, Barillas-Mury C, 2007. Reactive oxygen species detoxification by catalase is a major determinant of fecundity in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(7): 2121 - 2126.

Diaz-Albiter H, Mitford R, Genta FA, Sant'Anna MR, Dillon RJ, 2011. Reactive oxygen species scavenging by catalase is important for female *Lutzomyia longipalpis* fecundity and mortality. *PLoS ONE*, 6(3): e17486.

Dizdaroglu M, Jaruga P, 2012. Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic. Res*., 46(4): 382 - 419.

Feng CJ, Dai HG, Wu SW, 2001. Stress response of *Nilaparvata lugens* at high temperature and activities of its protective enzyme systems. *Chin. J. Appl. Ecol*., 12(3): 409 - 413. [冯从经, 戴华国, 武淑文, 2001. 褐飞虱高温条件下应激反应及体内保护酶系活性的研究. 应用生态学报, 12(3): 409 - 413]

Hu Z, Zuo HL, Li YN, Huang JF, Hu MY, 2013. Cloning, sequence analysis and expression profiling of cDNA coding for catalase from the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomol. Sin*., 54(11): 1249 - 1257. [胡振, 左洪亮, 李亚楠, 黄劲飞, 胡美英, 2013. 甜菜夜蛾过氧化氢酶 cDNA 克隆、序列分析及表达特征. 昆虫学报, 54(11): 1249 - 1257]

Imai H, Nakagawa Y, 2003. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radic. Biol. Med*., 34(2): 145 - 169.

Iwanaga S, Lee BL, 2005. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *J. Biochem. Mol. Biol*., 38(2): 128 - 150.

Jiang XF, Zhang L, Chen YX, Luo LZ, 2014. Novel features, occurrence trends and economic impact of the oriental armyworm, *Mythimna separata* (Walker) in China. *Chin. J. Appl. Entomol*., 51(6): 1444 - 1449. [江幸福, 张蕾, 程云霞, 罗礼智, 2014. 我国粘虫发生危害新特点及趋势分析. 应用昆虫学报, 51(6): 1444 - 1449]

Kim BY, Kim HJ, Lee KS, Seo SJ, Jin BR, 2008. Catalase from the white-spotted flower chafer, *Protaetia brevitarsis*: cDNA sequence, expression, and functional characterization. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 149(1): 183 - 190.

Klichko VI, Radyuk SN, Orr WC, 2004. Profiling catalase gene expression in *Drosophila melanogaster* during development and aging. *Arch. Insect Biochem. Physiol*., 56(1): 34 - 50.

Kregel KC, Zhang HJ, 2007. An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects and pathological considerations. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol*., 292(1): R18 - R36.

Krishnan N, Kodrik D, 2006. Antioxidant enzymes in *Spodoptera littoralis* (Boisduval): are they enhanced to protect gut tissues during oxidative stress? *J. Insect Physiol*., 52(1): 11 - 20.

Krishnan N, Kodrik D, Turanli KF, Sehnal F, 2007. Stage-specific distribution of oxidative radicals and antioxidant enzymes in the midgut of *Leptinotarsa decemlineata*. *J. Insect Physiol*., 53(1): 67 - 74.

Lemaitre B, Hoffmann J, 2007. The host defense of *Drosophila*

melanogaster. *Annu. Rev. Immunol*., 25(1): 697-743.

Liu B, Jia R, Han C, Huang B, Lei J, 2016. Effects of stocking density on antioxidant status, metabolism and immune response in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Comp. Biochem. Physiol. C*, 190: 1-8.

Lu Y, Bai Q, Zheng X, Lu Z, 2017. Expression and enzyme activity of catalase in *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae) is responsive to environmental stresses. *J. Econ. Entomol*., 110(4): 1803-1812.

Luo LZ, Li GB, Cao YZ, Hu Y, 1995. Effects of larvae density on adults' flight ability and reproduction in *Mythimna separata*. *Acta Entomol. Sin*., 38(1): 38-44.［罗礼智, 李光博, 曹雅忠, 胡毅, 1995. 粘虫幼虫密度对成虫飞行与生殖的影响. 昆虫学报, 38(1): 38-44］

Martindale JL, Holbrook NJ, 2002. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J. Cell. Physiol*., 192(1): 1-15.

Molina-Cruz A, DeJong RJ, Charles B, Gupta L, Kumar S, Jaramillo-Gutierrez G, Barillas-Mury C, 2008. Reactive oxygen species modulate *Anopheles gambiae* immunity against bacteria and plasmodium. *J. Biol. Chem*., 283(6): 3217-3223.

Nair PM, Park SY, Choi J, 2011. Expression of catalase and glutathione S-transferase genes in *Chironomus riparius* on exposure to cadmium and nonylphenol. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 154(4): 399-408.

Orr EC, Bewley GC, Orr WC, 1990. cDNA and deduced amino acid sequence of *Drosophila* catalase. *Nucleic Acids Res*., 18(12): 3663.

Qin J, Lu M, Zheng Y, Du Y, 2017. Molecular cloning, characterization, and functional analysis of catalase in *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). *Ann. Entomol. Soc. Am*., 110(2): 212-220.

Rikans LE, Hornbrook KR, 1997. Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. *Biochim. Biophys. Acta*, 1362(2-3): 116-127.

Schwarz KB, 1996. Oxidative stress during viral infection: a review. *Free Radic. Biol. Med*., 21(5): 641-649.

Suzuki N, Koussevitzky S, Mittler RON, Miller GAD, 2012. ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant Cell Environ*., 35(2): 259-270.

Tang QY, Zhang CX, 2013. Data Processing System (DPS) software with experimental design, statistical analysis and data mining developed for use in entomological research. *Insect Sci*., 20(2): 254-260.

Wang HS, Wang XH, Guo W, Zhang SF, Kang L, 2007. cDNA cloning of heat shock proteins and their expression in the two phases of the migratory locust. *Insect Mol. Biol*., 16(2): 207-219.

Wang ML, Zhu W, Zhang JH, Xu AY, Wang HT, Li X, Zhou GL, Zhang H, Qin QL, 2014. Oxidative damage is one of the most important causes of death of *Thitarodes xiaojinensis* (Lepidoptera: Hepialidae) larvae under heat stress. *Acta Entomol. Sin*., 57(7): 769-776.［王梦龙, 朱未, 张继红, 徐安英, 王红托, 李瑄, 周桂灵, 张寰, 秦启联, 2014. 氧化损伤是热胁迫下小金蝠蛾幼虫不能存活的重要原因. 昆虫学报, 57(7): 769-776］

Wang Y, Wang L, Zhu Z, Ma W, Lei C, 2012. The molecular characterization of antioxidant enzyme genes in *Helicoverpa armigera* adults and their involvement in response to ultraviolet-A stress. *J. Insect Physiol*., 58(9): 1250-1258.

Xie N, Jiang XF, Luo LZ, Zhang L, 2012. Effects of Cry1Ac toxin on activities of some enzymes in the larval midgut of the oriental armyworm, *Mythimna separata* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomol. Sin*., 55(2): 168-175.［解娜, 江幸福, 罗礼智, 张蕾, 2012. Cry1Ac 杀虫蛋白对粘虫中肠几种酶活性的影响. 昆虫学报, 55(2): 168-175］

Xu J, Lu MX, Huang DL, Du YZ, 2016. Molecular cloning, characterization, genomic structure and functional analysis of catalase in *Chilo suppressalis*. *J. Asia-Pac. Entomol*., 20(2): 331-336.

Yamamoto K, Banno Y, Fujii H, Miake F, Kashige N, Aso Y, 2005. Catalase from the silkworm, *Bombyx mori*: gene sequence, distribution, and over expression. *Insect Biochem. Molec. Biol*., 35(4): 277-283.

Zhang X, Li Y, Wang J, Zhang T, Li T, Dong W, Ma E, Zhang J, 2016. Identification and characteristic analysis of the catalase gene from *Locusta migratoria*. *Pestic. Biochem. Physiol*., 132: 125-131.

Zhang YH, Zhang Z, Jiang YY, Zeng J, Gao YB, Cheng DF, 2012. Preliminary analysis of the outbreak of the third-generation army worm *Mythimna separata* in China in 2012. *Plant Prot*., 38(5): 1-8.［张云慧, 张智, 姜玉英, 曾娟, 高月波, 程登发, 2012. 2012 年三代黏虫大发生原因初步分析. 植物保护, 38(5): 1-8］

Zhao H, Yi X, Hu Z, Hu M, Chen S, Muhammad RU, Dong X, Gong L, 2013. RNAi mediated knockdown of catalase causes cell cycle arrest in SL-1 cells and results in low survival rate of *Spodoptera litura* (Fabricius). *PLoS ONE*, 8(3): e59527.

（责任编辑：马丽萍）